Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 2, Summer 2021, P. 155-167

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۱۶۷-۱۵۵

مقاله پژوهشی

واکنش ژنوتیپ‌های سویای دارای آلل‌های ژن مقاومت (*Rsv1*) به آلودگی با سه سویه از ویروس موزائیک سویا

جواد رمضانی اول ریابی[۱]- محسن مهرور[۲*]- محمد زکی عقل[۳]- علیرضا محمدزاده[٤]- محمدرضا حاجی مراد[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۹

چکیده

ژن‌های مقاومت گیاه (R)، شناسایی هشدارهای (Signals) غیر بیماری‌زایی (Avirulent) مربوط به بیمارگرها را که منجر به فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند، برعهده دارند. از مدت‌ها پیش تصور بر این است که تحت‌فشار انتخاب، نرخ موتاسیون بالای ویروس‌های دارای ژنوم آران‌ای (RNA)، به همراه اندازه بزرگ جمعیت و فاصله کوتاه تولید نسل، باعث ظهور جهش‌یافته‌هایی (Mutants) از عوامل بیماری‌زا می‌شود که قادرند از شناسایی به‌وسیله ژن‌های R میزبان فرار کنند. در این مطالعه، پاتوسیستم Rsv1/ (SMV) *Soybean mosaic virus* برای شناسایی این فرضیه بکار برده شد. ژنوتیپ‌های سویای دارای آلل‌های مقاومت *Rsv1* با عصاره دارای نتاج ویروسی همسانه عفونی سویه‌های N، G7 و G7d ویروس موزائیک سویا روی گیاهان سویای حساس، مایه‌زنی شدند. بعد از گذشت بیست و یک روز از مایه‌زنی، گیاهان فاقد علایم ویروسی توسط آزمون الیزای غیرمستقیم (Indirect ELISA) بررسی شدند. یکی از ده گیاه York و Kwanggyo و دو گیاه از سی گیاه Ogden مایه‌زنی شده با عصاره دارای نتاج ویروسی به‌دست‌آمده از تکثیر مولکول دی‌ان‌ای مکمل (cDNA) سویه N ویروس موزائیک سویا روی گیاهان سویای حساس که در آزمایشگاه همسانه‌سازی شده بود (molecularly cloned SMV-N یا pSMV-N)، علایم ویروسی را نشان دادند و در آزمون الایزای غیرمستقیم، مثبت بودند. در مایه‌زنی مکانیکی انجام شده با استفاده از عصاره به‌دست‌آمده از این گیاهان، مجدداً ویروس به گیاهان York، Kwanggyo و Ogden منتقل شده و توانست با این گیاهان سازگار شود. بعد از انجام آزمون آرتی پی‌سی‌آر (RT-PCR) و پی‌سی‌آر آشیانه‌ای (Nested PCR) و تعیین ترادف طول کامل سیسترون‌های HC-Pro (Helper Component-Protease) و P3 ویروس، موقعیت جهش نقطه‌ای ایجادشده و اسیدآمینه رمز شده در اثر تغییر نوکلئوتید در نقطه جهش، با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 مشخص شد. در گیاهان York و Kwanggyo، جهش نقطه‌ای در سیسترون HC-Pro و به ترتیب در موقعیت‌های نوکلئوتیدی T۱۱۳۸ و A۱۲۱۰ و در گیاه Ogden، در سیسترون P3 ویروس و در موقعیت نوکلئوتیدی A۳۰۷۹ مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: جهش نقطه‌ای، ژن مقاومت *Rsv1*، سویا، ویروس موزائیک سویا

مقدمه

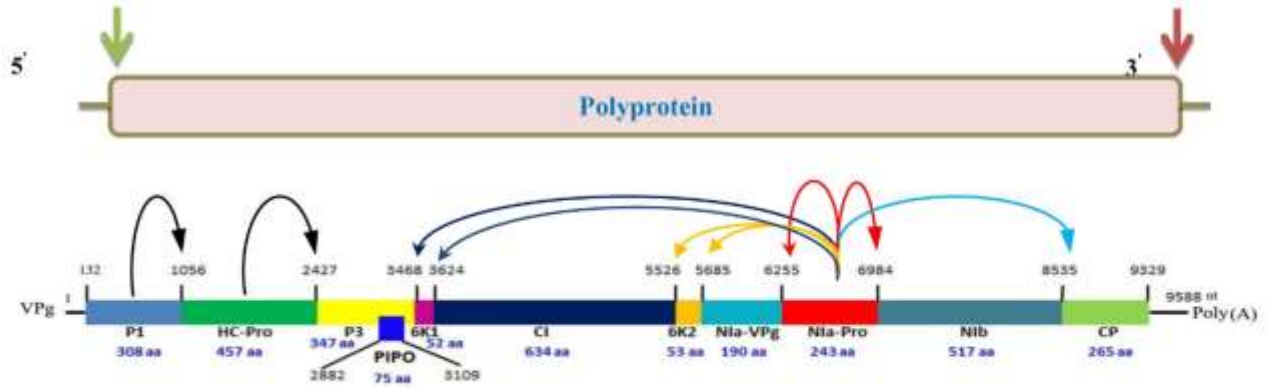
سویا [*Glycine max* (L.) Merr.]، گیاهی یک‌ساله، و یکی از مهم‌ترین اعضا خانواده بقولات در سطح جهان می‌باشد. پس از غلات، دانه‌های روغنی یکی از مهم‌ترین محصولات استراتژیک کشاورزی محسوب می‌شوند. در این میان، سویا با داشتن ۱۸ درصد روغن و ۵۰ درصد پروتئین، سهم بسزایی را در تولید، به خود اختصاص داده و ۴۸ درصد تولید دانه‌های روغنی را در دنیا، شامل می‌شود (۱۳). بسیاری از عوامل بیمارگر زنده و غیر زنده وجود دارند که این محصول استراتژیک را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش عملکرد آن در سطح جهان می‌شوند. ویروس‌ها، از جمله این عوامل بیمارگر بوده که در تمام نواحی کشت سویا در جهان، وجود داشته و می‌توانند اثرات مخربی روی این محصول داشته باشند. تاکنون بالغ بر ۱۱۱ ویروس یا سویه ویروسی متعلق به جنس‌ها و خانواده‌های ویروس‌های گیاهی مختلف شناسایی شده‌اند که قادرند سویا را در شرایط طبیعی آلوده کنند (۲۱).

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری رشته بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mehrvar@um.ac.ir)
۴- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد
۵- دانشیار دپارتمان حشره‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، انستیتوی کشاورزی، دانشگاه تنسی آمریکا، ناکسویل

DOI: 10.22067/jpp.2021.32763.0

۲۷ ویروس از این مجموعه، نسبت به بقیه، مهم‌تر بوده و به‌طور بالقوه در مناطق کشت سویا، مسئله‌ساز می‌باشند (۷). شایع‌ترین این ویروس‌ها که خسارت قابل توجهی به محصول سویا وارد می‌کنند، متعلق به دو خانواده *Potyviridae* و *Comoviridae* هستند (۲۲، ۲۳).

در بین این ویروس‌ها، ویروس موزائیک سویا (*Soybean mosaic virus*; SMV)، به دلیل خسارت زیادی که همه‌ساله به محصول سویا وارد می‌کند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده، طوری‌که گاهی خسارت حاصل از آن تا بیش از ۵۰ درصد عملکرد محصول برآورد شده است (۱). خسارت ناشی از این ویروس بسته به رقم سویا، سویه ویروس و شرایط محیطی متفاوت می‌باشد. ژنوم این ویروس، مانند ژنوم سایر پوتی‌ویروس‌ها می‌باشد. این ویروس، بذربرد بوده و آلودگی اولیه در مزرعه توسط بذرهای آلوده ایجاد شده و سپس شته‌های ناقل، باعث گسترش آن شده و کاهش کمیت و کیفیت محصول را در مناطق تولید سویا به همراه دارد. بالغ‌بر ۳۵ گونه شته می‌توانند این ویروس را به روش ناپایا در آزمایشگاه، به گیاهان سالم انتقال دهند. ولی تعداد خیلی کمتری شته شناسایی شده که می‌توانند ویروس را در مزرعه انتقال دهند. در شمال امریکای مرکزی، شته‌های *Myzus persicae*، *Macrosiphum euphorbiae*، *Aphis crassivora*، *Rhopalosiphum maidis* و *R. padi* بیش از ۹۰ درصد انتقال ویروس در مزرعه را انجام می‌دهند. در الینویز، دو گونه *Aphis crassivora* و *M. euphorbiae* که در اواخر بهار و اوایل تابستان، بیشترین پرواز را دارند، از کارایی نسبتاً بالایی در انتقال این ویروس در مزرعه برخوردار هستند (۱۱). آلودگی گیاه سویا به این ویروس در شرایط طبیعی باعث کاهش ۳۵ تا ۵۰ درصدی محصول و در حالت طغیانی بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصدی کاهش آن می‌شود. باتوجه‌به اینکه مهم‌ترین روش انتقال این ویروس، از طریق بذرهای آلوده می‌باشد، استفاده از بذر سالم و ارقام مقاوم به این ویروس، می‌تواند نقش مهمی در کنترل آن داشته باشد. ژنوم این ویروس، یک آران‌ای تک‌رشته‌ای مثبت می‌باشد (شکل ۱)، (۱۲ و ۱۵).



شکل ۱- سازمان ژنومی ویروس موزائیک سویا. این طرح براساس توالی نوکلئوتیدی سویه N ویروس، ترسیم شده است (۱۵). فلش‌ها، محل برش پلی‌پروتئین و تبدیل آن به پروتئین‌های فعال، توسط آنزیم‌های پروتئاز ویروس را نشان می‌دهند. فلش‌های عمودی سبز و قرمز، به ترتیب، کدون‌های شروع و خاتمه پلی‌پروتئین ویروس را نشان می‌دهند. شماره‌های بالای خطوط عمودی، موقعیت‌های شروع سیسترون‌های ویروس را نشان می‌دهند. اندازه پروتئین‌های ویروس (تعداد اسیدآمینه‌ها)، زیر اسم پروتئین با شماره‌های آبی‌رنگ مشخص شده است. پروتئین PIPO قرار گرفته داخل P3، بصورت چارچوبی به رنگ آبی تیره نشان داده شده است. این پروتئین در حرکت ویروس داخل میزبان نقش دارد. P1 یا پروتئین ۱، در تعیین دامنه میزبانی و بیماریزایی ویروس، HC-Pro یا پروتئاز کمکی، در بیماریزایی، انتقال ویروس بوسیله شته و بذر، جلوگیری از خاموشی ژن ویروس توسط گیاه و جابجایی ویروس در داخل گیاه، نقش دارد. P3 یا پروتئین ۳ و CI یا اینکلوژن سیتوپلاسمی در بیماری‌زایی ویروس، مهم هستند. NIa یا اینکلوژن هسته‌ای a و NIb یا اینکلوژن هسته‌ای b، به ترتیب، نقش پروتئازی و پلیمرازی دارند. VPg، پروتئین متصل به انتهای '5 ژنوم ویروس.

Figure 1- Genome organization of *soybean mosaic virus (SMV)*. The diagram was drawn based on the nucleotide sequences of the SMV N strain (15). The arrows show the location of the cut of the polyprotein and turn it into active proteins by the protease enzymes of the virus. The green and red vertical arrows represent, respectively, the codons for the start and stop of the viral polypeptide. The upper numbers of vertical lines represent the starting positions of the cistrons of the virus. The size of the viral proteins (the number of amino acids) is indicated by the name of the protein with blue numbers. The PIPO (Pretty Interesting Potyvirus ORF) protein located inside the P3 is shown in a dark blue framework. This protein plays a role in the virus movement inside the host. The P1 or protein 1, in determining of the host range and pathogenicity of the virus and the HC-Pro or helper component protease, in pathogenicity, the transmission of the virus by aphid and seed, suppression of RNA silencing by host genes and transferring the virus inside the plant play a role. P3 or protein 3 and CI or cytoplasmic inclusion are important in the pathogenesis of the virus. NIa or nuclear inclusions a and NIb or nuclear inclusion b, have the role of protease and polymerase chain reaction, respectively. VPg (Viral Protein genome-linked), a protein linked to the 5' end of genome.

گیاهان مکانیسم بسیار پیشرفته‌ای را برای شناسایی و مقابله با بیمارگرهای مهاجم به خدمت می‌گیرند که شامل استفاده از ژن‌های مقاومت غالب (R) هستند (۱۶). مکانیسم تشخیص، بر اساس فرضیه ژن برای ژن فلور (*Gene-for-Gene*) عمل کرده و از طریق تطبیق اختصاصی بین محصولات یک ژن R میزبان و یک ژن غیر بیماری‌زایی یا avirulent (*Avr*) بیمارگر که به‌واسطه برهم‌کنش‌های مستقیم یا غیر مستقیم به‌دست می‌آید، ایجاد می‌شود (۲۵). از نظر فنوتیپی، شناسایی ویروس‌های گیاهی به‌وسیله گیاه، به‌واسطه ژن‌های *R*، به شکل مقاومت بی‌نهایت (Extreme Resistance; ER) یا به‌صورت یک پاسخ فوق حساسیت (Hypersensitive Resistance; HR) بوده که در هر دو نوع مقاومت، تصور بر این است که نتیجه رویداد شناسایی ویروس توسط گیاه مقاوم باشد (۱۰).

بیمارگرها، ابزاری را برای شناسایی ژن‌های *R* یا توقف پاسخ مقاومت گیاه، ایجاد کرده‌اند. به‌دلیل عملکرد چندگانه محصولات ژنی ویروسی، تغییرات جزئی در ژن‌های *Avr*، تنها مکانیسم مقرون‌به‌صرفه ویروس، برای فرار از شناسایی به‌وسیله گیاه است. سه ژن مقاومت غالب (R) *Rsv1*، *Rsv3* و *Rsv4* در سویا شناسایی شده است که در مواردی برای کنترل بیماری مورد استفاده قرار گرفته است. در جدیدترین مطالعه انجام شده روی سویای رقم York، نشان داده شده است که جایگاه *Rsv1* و *Rsv1-y* روی کروموزوم شماره ۱۳ سویا، ۲/۲ سانتی‌مورگان اختلاف دارند. این اختلاف جایگاه، باعث شده است که *Rsv1-y* را که مقاومت به G1 را ایجاد می‌کند، ولی به G7 مقاومت ندارد، پیشنهاد شود که به *Rsv5* تغییر نام داده شود (۲۹). محققین آمریکایی، مجموعه‌ای از پاتوتیپ‌های استاندارد ویروس موزاییک سویا (SMV) را در گروه‌هایی به‌صورت SMV-G1 تا SMV-G7 برای مطالعه برهم‌کنش با ژنوتیپ‌هایی از سویاهای دارای ژن‌های *Rsv* یا آلل‌های آنها مورد استفاده قرار داده‌اند. ویروس موزائیک سویا در طبیعت از طریق بذر و شته منتقل می‌شود؛ بنابراین، انتظار می‌رود که در نتیجه فشارهای انتخاب ناشی از ارقام مختلف سویا، یا به‌وسیله انتقال از طریق بذرها و یا شته‌ها، تحت شرایط مزرعه، سویه‌های مختلفی از ویروس موزائیک سویا، در طول زمان ظاهر شده و شیوع پیدا کنند (۲). فنوتیپ مقاومتی که در اثر مایه‌زنی مکانیکی پاتوتیپ‌های G1 تا G7 ویروس موزائیک سویا، روی سویاهای دارای ژن مقاومت *Rsv1*، *Rsv3* و *Rsv4* ظاهر می‌شود، متفاوت است. همچنین، واکنش آلل‌های این ژن‌های R در مقابل سویه‌های مختلفSMV متفاوت است (۲۹). *Rsv1*، یک جایگاه (locus) چندژنی غالب مقاوم در لاین گیاه سویای معرف 96983 (Plant Introduction; PI 96983)، مقاومت بی‌نهایت (ER) را بعد از مایه‌زنی مکانیکی علیه اکثر سویه‌های SMV، شامل SMV-N (یک جدایه از G2)، به‌استثنای SMV-G7 و SMV-G7d (یک واریانت آزمایشگاهی ایجاد شده از SMV-G7) القاء می‌کند. در سویاهای دارای ژنوتیپ *Rsv1*، SMV-N یک جدایه غیر بیماری‌زای سویه G2، ER را ایجاد می‌کند، درحالی‌که سویه SMV-G7، پاسخ فوق حساسیت سیستمیک کشنده (Lethal Systemic Hypersensitive Response; LSHR) را ایجاد می‌کند. SMV-G7d، علایم موزائیک سیستمیک را باعث می‌شود؛ بنابراین برای سویاهای دارای ژنوتیپ *Rsv1*، SMV-N، غیر بیماری‌زا است، درحالی‌که SMV-G7 و SMV-G7d، هر دو بیماریزا هستند (۱۰، ۱۵).

بر اساس مطالعات گذشته، بیان حساسیت یا مقاومت میزبان در ارتباط با یک بیمارگر خاص، به ژنوتیپ هر دوی آنها وابسته است و قدرت بیماری‌زایی یک بیمارگر (virulence)، بر اساس ژنوتیپ میزبان بیان می‌شود؛ بنابراین برهم‌کنش بیمارگر – میزبان، به‌وسیله وجود یک ژن غالب *R* در گیاه که شناسایی مستقیم یا غیر مستقیم بیمارگر را از طریق شناسایی پروتئین‌های خاصی که توسط بیمارگر تولید می‌شود برعهده دارد، تعیین می‌شود (۹ و ۲۴).

در این مطالعه که در دانشگاه تنسی امریکا انجام شد، ژنوتیپ‌هایی از سویا که دارای آلل‌هایی از ژن مقاومت*Rsv1* بودند استفاده شدند. هدف از این مطالعه، بررسی واکنش آلل‌های مختلف *Rsv1* سویا به سویه‌های ویروس موزائیک سویا از گروهای G2 و G7 و تعیین وراثت حساسیت و مقاومت به سویه N ویروس موزائیک سویا در ارقام سویای York، Kwanggyo و Ogden در اثر جهش نقطه‌ای در سیسترون‌های P3 و HC-pro ویروس بود.

در این مطالعه، برهم‌کنش بین سه سویه از ویروس موزائیک سویا (SMV-N، G7- و G7d) و هفت ژنوتیپ سویای دارای آلل‌های ژن مقاومت *Rsv1* مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

مواد و روش‌ها

منبع سویه‌های ویروس

همسانه‌های عفونی دی‌ان‌ای مکمل (Infectious cDNA Clones) مربوط به سویه N (pSMV-N) و سویه G7 (pSMV-G7) ویروس موزائیک سویا که به‌عنوان والد و به روش بیولیستیکی، با استفاده از تفنگ ژنی (Bio-Rad laboratories Hercules CA)، روی گیاه سویای رقم حساس Essex (*rsv1*) انتقال و تکثیر شدند. سویه G7d (pSMV-G7d) که روی برگ‌های سویای رقم حساس Williams 82 (*rsv1*) منتقل و تکثیر شده بود و در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند، به‌عنوان منبعی از پاتوتیپ‌های استاندارد ویروس موزائیک سویا، برای مایه‌زنی مکانیکی گیاهان، مورد استفاده قرار گرفتند (۹ و ۲۶).

جدول ۱- واکنش ژنوتیپ‌های سویای دارای آلل‌های ژن مقاومت *Rsv1* به هفت گروه از سویه‌های SMV (21)

Table 1- Reactions of soybean genotypes containing *Rsv1* alleles to seven strain groups of SMV (21)

ژنوتیپ‌های سویا Soybean genotypes	آلل‌های *Rsv1* Alleles of *Rsv1*	گروه‌های سویه ویروس موزائیک سویا SMV Strain Groups G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	منبع Reference
PI 96983	*Rsv1*	R	R	R	R	R	R	N	18
Ogden	*Rsv1-t*	R	R	N	R	R	R	N	4
York	*Rsv1-y*	R	R	R	N	S	S	S	4
Marshal	*Rsv1-m*	R	N	N	R	R	N	R	4
Kwanggyo	*Rsv1-k*	R	R	R	R	N	N	N	4
Tousan 50	*Rsv1-n*	N	N	S	S	N	N	S	20
Raiden	*Rsv1-r*	R	R	R	R	N	N	R	5
Suweon 97	*Rsv1-sk*	R	R	R	R	R	R	R	6
Williams 82	*rsv1*	S	S	S	S	S	S	S	30

N= بافت‌مردگی (necrosis); R= مقاوم (resistance); S= حساس (susceptible)

مایه تلقیح

بافت‌های آلوده به ویروس (Viral Progenies) گیاهان سویای حساس Essex و Williams 82 که به روش بیولیستیکی آلوده شده بودند، در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH 7 با استفاده از هاون چینی، عصاره‌گیری شدند. عصاره حاصل، با روش مکانیکی روی برگ‌های اولیه (unifoliate) ارقام مختلف سویا که از قبل با کاربوراندوم (۶۰۰ مش) گردپاشی شده بودند، مایه‌زنی شد (۲).

ارقام سویا

سویای رقم Williams 82 (*rsv1*)، حساس به تمام سویه‌های ویروس موزائیک سویا (۹)؛ PI 96983 (*Rsv1*)، مقاوم به تمام سویه‌ها (به جز G7 و G7d که علایم بافت‌مردگی و موزائیک را نشان می‌دهند)؛ ارقام سویای Kwanggyo (*Rsv1-k*)، Marshal (*Rsv1-m*)، Ogden (*Rsv1-t*)، Raiden (*Rsv1-r*)، Suweon 97 (*Rsv1-sk*)، Tousan 50 (*Rsv1-n*) و York (*Rsv1-y*) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. بذر این ژنوتیپ‌ها، در مرکز آموزش و تحقیقات شرق تنسی [East Tennessee Research and Education Center (ETREC) ; Knoxville, TN 37996-4576] تکثیر شده بود. تمام این بذرها، از گیاهان سویای پرورش داده شده در مزارع عاری از ویروس موزائیک سویا تهیه شده و سلامت و اصالت آنها گواهی شده بود.

بذرهای ارقام مختلف، در گلدان‌های حاوی خاک پیت ماس کشت داده شدند. در هر گلدان، حدود ۵۰ بذر کشت شد. گلدان‌ها به اتاقک رشد، با شرایط دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد. بعد از گذشت سه روز، بذرهای جوانه‌زده، به گلدان‌های جدیدی انتقال و نشاء شد. در هر گلدان، ۵ گیاهچه نشاء شد و مشخصات گیاهچه و تاریخ نشاء روی اتیکت درج گردید. گلدان‌ها در اتاقک‌های رشد با شرایط دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. بعد از گذشت یک هفته، مایه‌زنی مکانیکی سویه‌های ویروس، روی برگ‌های اولیه (دوبرگی) از قبل گردپاشی شده با کاربوراندوم انجام شد. برای هر سویه ویروس که روی ارقام مختلف سویا مایه‌زنی شد، یک گلدان از گیاهچه‌های سویای رقم حساس ویلیامز نیز به‌عنوان شاهد (positive control)، مایه‌زنی شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده، به اتاقک‌های رشد منتقل و در شرایط دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

ردیابی ویروس موزائیک سویا

بعد از گذشت ۲۱ روز از مایه‌زنی، ردیابی ویروس باتوجه‌به علایم مشاهده شده و با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی الیزای غیر مستقیم (indirect-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)) و مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)) انجام شد.

آزمون الایزای غیر مستقیم

شناسایی سرولوژیکی ویروس برطبق روش لومل و همکاران (۱۹) و در حضور ایمونوگلوبین جی (IgG) ویروس موزائیک سویا (تهیه شده برضد پوشش پروتئینی ویروس در بخش ویروس‌شناسی دانشگاه تنسی) و ایمونوگلوبین جی عمومی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (Anti-Rabbit IgG(whole molecule)-Alkaline phosphatase conjugate, produced in goat; Sigma Aldrich,

USA) انجام شد، با این تفاوت که برای بلوکه کردن چاهک‌های پلیت و رقیق کردن ایمونوگلوبین‌ها، از مخلوط شیر خشک بدون چربی در آب مقطر دو بار یونیزه، به نسبت ۵ درصد استفاده شد.

استخراج آران‌ای

استخراج آران‌ای کل، از برگ‌های سه‌تایی بالایی و کاملاً رشدیافته گیاه که به طور سیستمیک آلوده شده بودند، با استفاده از کیت RNeasy Mini kit (Qiagen,Valencia, CA, USA) و برطبق دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس و آشیانه‌ای

ساخت رشته دی ان ای مکمل ویروس، در حضور آنزیم نسخه‌بردار معکوس Super Script reverse-transcriptase III (Invitrogen, Carlsbad, CA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در این مرحله، از آغازگرهای تصادفی شش‌تایی (IA, USA) به‌عنوان آغازگر استفاده شد.

آغازگر SMV-۳۹۱۰a، در همه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، بکار برده شد. این آغازگر، به همراه آغازگر G7-239s برای تکثیر طول کامل (Full-length) سیسترون‌های P3 و HC-pro (Helper Component-Protease) ویروس‌های حاصل از مایه‌زنی (Progenies) بکار برده شد (جدول ۲). پی‌سی‌آر آشیانه‌ای (Nested PCR)، با دو جفت آغازگر SMV-482s و SMV-3840a و با استفاده از محصول به‌دست‌آمده و خالص شده از پی‌سی‌آر اول (به‌عنوان الگو) انجام شد (جدول ۲).

جدول ۲- توالی‌های آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در آزمون آرتی پی سی آر، پی سی آر آشیانه‌ای و تعیین توالی

Table 2- Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR, Nested PCR and Sequencing

نام آغازگر Primer name	توالی (۳′-۵′) Sequence (5´-3´)	موقعیت Position*
SMV-3910a	AAACCTGTTGATTTCCCTGAGCC	3910-3888
SMV-3840a	CCAAATTTGCAATTTTGGCTGCTG	3840-3817
SMV-1614a	GGTTGAGTAGTGCTTT	1614-1599
G7-239s	TTCAGGCAGTTCAGATGGCGAAACAA	239-264
SMV-482s	GAAGCGGCAATTGCAAGGCGAAAGCAAG	482-509
SMV-1468s	TCACATGCTTCAAATACAGGATATTAATAAG	1468-1498
SMV-2919s	CGCGCATTAAGCTGGTTG	2916-2933
SMV-2289s	ATTTTGGTTGACCATGCGT	2289-2307

*موقعیت نوکلئوتیدها روی ژنوم *Soybean mosaic virus* (SMV) براساس توالی‌های همسانه عفونی سی‌دی‌ان‌ای مکمل SMV-N (شماره دسترسی در بانک ژن D00507).

*The position of oligonucleotides on the *Soybean mosaic virus* (SMV) genome are based on sequences of the infectious cDNA clone of SMV-N (Gen Bank Accession No. D00507).

محصول به‌دست‌آمده از پی‌سی‌آر آشیانه‌ای، دارای قطعات کامل سیسترون‌های P3 و HC-Pro بود. پی‌سی‌آر اول و آشیانه‌ای، در حضور آنزیم EX *Taq* polymerase (Takara Bio, Madison, WI) و برطبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

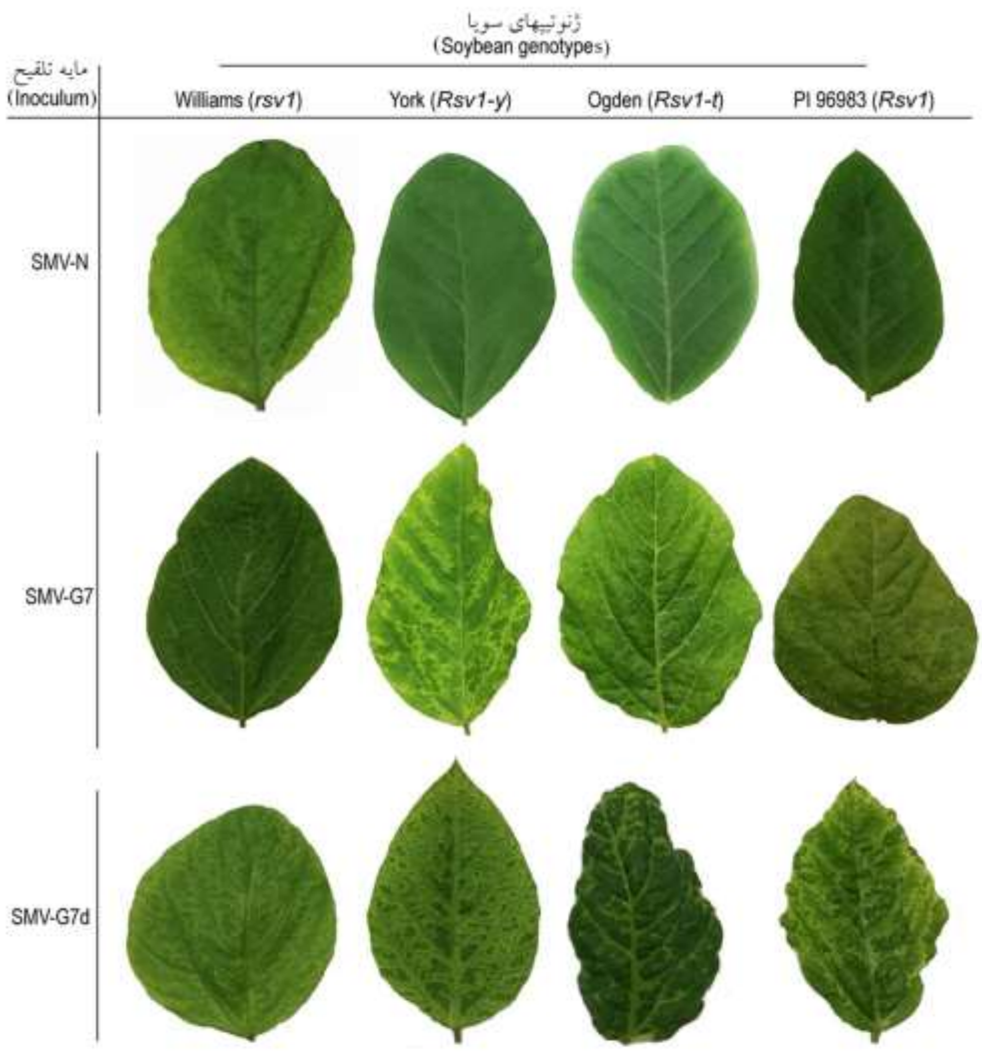
تعیین ترادف و تجزیه‌وتحلیل محصول واکنش‌های پی‌سی‌آر

محصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای، با استفاده از کیت‌های QIA quick-PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) و MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) خالص‌سازی شد و محصول خالص‌شده بعد از کنترل کیفی با دستگاه طیف‌سنج نوری (NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer)، به همراه آغازگرهای SMV-1468s، SMV-1614a، SMV-2289s و SMV-2916s (جدول ۲) برای تعیین ترادف سیسترون‌های P3 و HC-Pro ویروس (Progenies)، به مرکز تعیین ترادف دانشگاه تنسی (The University of Tennessee DNA Sequencing Facility) ارسال گردید. ترادف‌های دریافتی، با نرم افزار Finch TV (https://softfamous.com/finchtv)، ویرایش شد و با استفاده از نرم افزار MEGA7 (https://en.freedownloadmanager.org/Windows-PC/MEGA-FREE.html) تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج و بحث

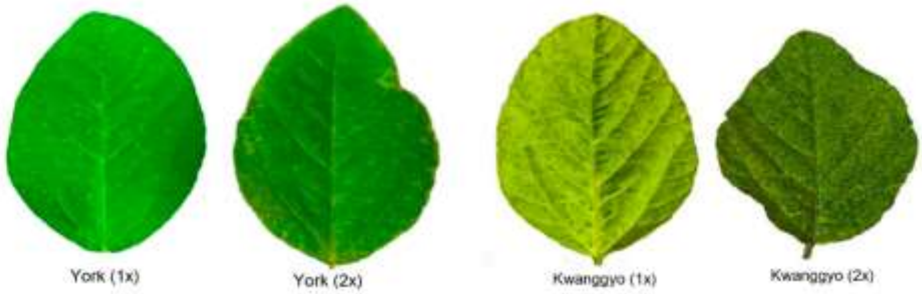
واکنش گیاهان مایه‌زنی شده با سویه‌های N، G7 و G7d بعد از گذشت بیست و یک روز از مایه‌زنی، بررسی شد. علایم مشاهده شده روی ژنوتیپ‌های مختلف سویا، تا حدود زیادی با مطالعات سایر محققین مطابقت داشت. این علایم، از موزائیک خفیف تا موزائیک

شـدید، بدشـکلی و چین‌خوردگی سـطح برگ، مشـاهده شد (۴، ۲۰ و ۲۸). در بعضـی از ارقام، از جمله رقم Tousan 50، بعد از گذشت پنج روز از مایه‌زنی با سویه N ویروس، لکه‌های نکروتیک، روی برگ‌های دوتایی مایه‌زنی‌شـده و موزائیک شـدید در برگ‌های سـه‌تایی گیاه مشـاهده شـد. این لکه‌های نکروتیک، روی برگ‌های دوتایی مایه‌زنی شـده با سـویه N، در سـایر ارقام، مشـاهده نشـد. در گیاهان York، Ogden و PI96983 در مـایـه‌زنی با سـویه G7 علایم موزائیک را نشان دادند. در مایه‌زنی این گیاهان با سویه آزمایشگاهی G7d، علایم موزائیک شـدید و بدشـکلی برگ مشـاهده شد (جدول ۳)، (شکل ۲). یـک گیـاه از گیـاهـان York و Kwanggyo و دو گیـاه از گیـاهـان Ogden، مایه‌زنی شده با نتاج ویروسی سویه N (Progeny viruses)، علایم ویروس را نشان دادند. این گیاهان، در آزمون الیزا علیه ویروس، مثبـت بودند. در مایه‌زنی مکانیکی انجام شـــده از این گیاهان به گیاه حســـاس Williams 82 و گیـاهان York و Kwanggyo، ویروس توانســت در این گیاهان تکثیر شــده و علایم موزائیک شــدیدتری را نشان دهد (شکل ۳).



شکل ۲- علایم مشاهده شده در ژنوتیپ‌های سویای مایه‌زنی مکانیکی شده، بعد از ۲۱ روز، با عصاره دارای نتاج ویروسی حاصل از گیاهان حساس Essex (*rsv1*) و Williams 82 (*rsv1*) آلوده شده به روش بیولیستیک (تفنگ ژنی)، با همسانه‌های عفونی cDNA. نوار مقیاس= ۱ سانتی‌متر

Figure 2- Observed symptoms on soybean genotypes inoculated mechanically, 21 days post inoculation, with the sap containing progeny viruses derived from ‘Essex’ (*rsv1*) [SMV-N and G7] and ‘Williams82’ (*rsv1*) [G7d] biolistically inoculated with infectious cDNA clones. Inoculated plants were maintained at 22°C until leaflets from trifoliate leaves were photographed 21 dpi. Scale bar = 1cm.



شکل ۳- علایم مشاهده شده درگیاهان York و Kwanggyo بعد از ۲۱ روز از مایه‌زنی مکانیکی اول با نتاج سویه N ویروسی [York (1x) و Kwanggyo (1x)] ؛ علایم مشاهده شده از پاساژ دوم ویروس در گیاهان York و Kwanggyo مایه‌زنی شده با عصاره حاصل از گیاهان York و Kwanggyo آلوده شده در پاساژ اول [York (2x) و Kwanggyo (2x)].

Figure 3– Symptoms observed in York and Kwanggyo plants 21 days after mechanical inoculation (dpi) with progenies of the viral N strain [Kwanggyo(1x) and York(1x)]; Symptoms observed from second passage of the virus in York and Kwanggyo inoculated with sap from York and Kwanggyo infected in first passage [Kwanggyo (2x) and York (2x)].

جدول ۳- تعداد گیاهان آلوده شده بطور سیستمیک به تعداد گیاهان مایه‌زنی شده روی برگ‌های اولیه با عصاره دارای نتاج ویروس‌ها

Table 3- Number of systemically infected plants / number of primary leaves inoculated plants with sap containing progeny viruses derived from infectious molecular clones

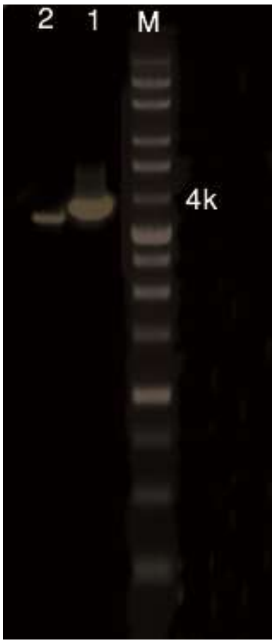
	سویه‌های ویروس Virus strains		
ژنوتیپ‌های سویا Soybean genotypes	**SMV-N**	**SMV-G7**	**SMV-G7d**
Williams 82 (*rsv1*)	11/12	12/12	14/14
Kwanggyo (*Rsv1-k*)	1[a]/10(3/3)[b]	2/22	5/22
Raiden (*Rsv1-r*)	0/10	0/7	0/7
York (*Rsv1-y*)	1[a]/10(3/3)[b]	10/10	10/10
Touson 50 (*Rsv-n*)	10/10	10/10	10/10
Marshal (*Rsv1-m*)	3/10	8/10	3/8
Suweon (*Rsv1-sk*)	0/10	0/10	0/10
Ogden (*Rsv1-t*)	2[c]/30	9/10	11/11
PI 96983 (*Rsv1*)	0/10	10/10	10/10

a: تعداد گیاه دارای علایم و مثبت در آزمون الیزا از ۱۰ گیاه مایه‌زنی شده بصورت مکانیکی، b: تعداد گیاهان آلوده شده به تعداد گیاهان مایه‌زنی شده در پاساژ دوم، c: تعداد گیاه دارای علایم به تعداد گیاهان مایه‌زنی شده که در آزمون الیزا مثبت بود.

a= number of plants containing symptoms and ELISA positive out of 10 plant inoculated mechanically. b= number of plants infected out of number of plants inoculated mechanically in second passage. C= number of plants infected and ELISA positive out of number of plant inoculated mechanically.

بعد از استخراج آران‌ای کل از گیاهان York، Kwanggyo و Ogden آلوده شده با نتاج ویروسی (Viral progeny) ناشی از همسانه عفونی pSMV-N و انجام آزمون آرتی پی‌سی‌آر و پی‌سی‌آر آشیانه‌ای (شکل ۴)، محصول خالص‌شده آن، تعیین ترادف شد و مشخص شد که در گیاه York، ویروس با جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید تیمین شماره ۱۱۳۸ (T۱۱۳۸) خود، واقع در سیسترون HC-Pro، با جایگزینی یک نوکلئوتید سیتوزین به‌جای تیمین و تبدیل اسیدآمینه لیزین به آرژنین، توانسته است بر مقاومت گیاه فائق آید. بعد از مایه‌زنی عصاره گیاه York آلوده شده به ویروس به گیاهان York و Williams 82 سالم (به‌عنوان گیاه حساس شاهد)، بعد از گذشت ۲۱ روز از مایه‌زنی، علایم ویروسی روی این دو رقم سویا مشاهده شد. پس از استخراج آران‌ای از این دو رقم و انجام آزمون آرتی پی‌سی‌آر و

تعیین ترادف محصـول پی‌سـی‌آر، در این گیاهان نیز مشـاهده شد که جهش نقطـه‌ای در همـان نوکلئوتیـد قبلی صـــورت‌گرفتـه اســـت و اسیدآمینه لیزین به آرژنین تبدیل شده است. مشاهده دوباره این جهش نقطـه‌ای، می‌توانـد بیانگر این حقیقت باشـــد که جهش در نقطه ذکر شده، جهشی عملکردی بوده و با این جهش، ویروس توانسته است بر مقـاومـت گیـاه فـائق آمده و آلودگی تداوم داشـــته باشـــد. در مورد ژنوتیپ‌های Kwanggyo و Ogden مقاوم به ســـویه N ویروس نیز مشاهده شد که ویروس با جهش نقطه‌ای در سیسترون‌های HC-Pro (A۱۲۱۰) و P3 (A۳۰۷۹) خود، توانســـته اســـت به ترتیب با تبدیل اسـیدآمینه لیزین و آسپاراژین به گلوتامیک اسید و آسپاراتیک اسید، بر مقـاومت این ژنوتیپ‌ها غلبه کند. در مورد دو ژنوتیپ Kwanggyo و Ogden نیز مـاننـد ژنوتیپ York، انتقال مکانیکی ویروس از این دو گیاه آلوده شده، به گیاهان سالم آنها و دو گیاه حساس ویلیامز به‌عنوان شـاهد برای دو ژنوتیپ و انجام فرایند شـناسایی جهش نقطه‌ای مانند قبـل، نشـــان داد کـه جهش در نقطـه مورد نظر قبلی، ثـابت بوده و عملکردی می‌باشـــد (جدول ۵) که این موضـــوع با مطالعات ســـایر محققین کـه هر دو ســـیســـترون‌هـای HC-Pro و P3 را بـه‌عنوان محرک *Rsv1* در شناسایی ویروس نشان داده‌اند مطابقت دارد (۸، ۱۲، ۲۷ و ۲۹).



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول آرتی پی‌سی‌آر و پی‌سی‌آر آشیانه‌ای. M: نشانگر، ۱: محصول آرتی پی‌سی‌آر، ۲: محصول پی‌سی‌آر آشیانه‌ای

Figure 4- Electrophoretic profiles of RT-PCR and Nested PCR product. M: 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1: RT-PCR product; 2: Nested PCR product

این اولین گزارش از جهش و انتخـاب برای بـه‌دســـت‌آوردن بیمـاری‌زایی (Virulence) در نتـاج SMV-N در گیـاهـان York (*Rsv1-y*)، Kwanggyo (*Rsv1-k*) و Ogden (*Rsv1-t*) می‌باشـــد. این نتـایج، با مطالعات ســـایر محققین، مبنی‌بر اینکه تعیین‌کننده‌های (Determinants) بیمـاری‌زایی ویروس‌ها، یا از طریق بررســـی ارقام ظـاهر شـــده در طبیعت و یا از طریق تکامل آزمایشـــگاهی با انتقال سـریالی ویروس تحت فشـارهای انتخاب جدید، شـناسـایی می‌شوند، مطابقت دارد (۱۲، ۱۷ و ۲۸). در مطالعات مشابهی که در ارتباط با ژن مقاومت *Rsv4* انجام شـده، نشـان‌داده‌شده است که سویه N ویروس موزائیک سویا، روی ژنوتیپ V94-5152 که دارای ژن مقاومت *Rsv4* هســـت، غیر بیمـاری‌زا بوده، ولی روی ژنوتیـپ *PI88788* (*Rsv4*)، بیماری‌زا است. ولی یک جهش در نوکلئوتیدهای شماره ۱۰۳۳ (تبدیل گلوتـامین بـه لیزین) یـا ۱۰۵۴ (تبدیل گلیســـین به آرژنین) در داخل سـیسـترون P3 باعث ایجاد بیماری در ژنوتیپ V94-5152 می‌شود، درحـالی‌کـه هیچ تـأثیری در بیمـاری‌زایی ویروس، روی ژنوتیـپ PI88788 ندارد (۱۸). در مطالعه دیگری از ایران گزارش شـده اسـت که جهش در نوکلئوتید شماره ۱۰۵۳ (تبدیل سرین به آسپاراژین) واقع در سـیسترون P3 سویه غیر بیماری‌زای ویروس، باعث ایجاد بیماری

در سویاهای دارای ژن مقاومت *Rsv4* شده است، اگرچه این سویه روی ژنوتیپ V94-55152 غیر بیماری‌زا است (۳). ژن‌های مقاومت، مؤثرترین، سازگارترین و باصرفه‌ترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی با عامل ویروسی هستند، هرچند، نگرانی اصلی در مورد این ژن‌ها، دوام پایین آن‌ها در برابر ویروس‌هایی با ژنوم RNA هست، زیرا این ویروس‌ها ظرفیت جهش بالا و سازگاری سریع با میزبان دارند.

باتوجه‌به جهش‌های رخداده در ویروس و شکستن مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف سویا و همچنین با درنظرگرفتن اینکه ژنوم ویروس موزائیک سویا، از نوع آران‌ای بوده و امکان جهش در آن بالا است، می‌تواند زنگ خطری باشد برای بهنژادگران گیاهی تا نسبت به تولید گیاهان سویای دارای ژن مقاومت به سویه‌های مختلف ویروس، اقدام نمایند. همچنین، تلاقی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس و بررسی آللیسم ژن‌های مقاومت، می‌تواند در تولید ژنوتیپ‌های مقاوم، کمک مؤثری به بهنژادگران نماید (۱۴). مثل همه ویروس‌هایی که به روش غیر پایا منتقل می‌شوند، کنترل شیمیایی ناقلان شته‌ای، در کنترل ویروس تأثیر کمی دارد. هرچند، ارقام سویای دارای کرک‌های متراکم، به طور معنی‌داری، شیوع آلودگی کمتری به SMV، در مقایسه با ارقام فاقد کرک نشان داده‌اند، ولی کاراترین و از نظر محیطی، سازگارترین روش برای کنترل این ویروس، جدا از کشت بذرهای عاری از ویروس، کشت سویاهای مقاوم دارای ژن‌های مقاومت (*R*-genes) هرمی شده است. همچنین، سطح بالایی از مقاومت به SMV، در سویاهای تراریخته‌ای که مناطقی از ژنوم ویروس را بیان می‌کنند، ایجاد شده است (۱۳).

جدول ۵- جهش‌های نقطه‌ای مشاهده شده در سویه N

Table 5- Point Mutations found in SMV-N strain

	موقعیت نوکلئوتید جهش‌یافته **Position of mutated nucleotide**	موقعیت اسید آمینه جهش‌یافته **Position of mutated aminoacid**	اسیدآمینه اولیه **Original aminoacid**	اسیدآمینه جهش‌یافته **Mutated aminoacid**	کدون اولیه **Original codon**	کدون جهش‌یافته **Mutated codon**
Kwanggyo (1x)	1210	361	lysine	Glutamic acid	AAG	GAG
Kwanggyo (2x)	1210	361	lysine	Glutamic acid	AAG	GAG
[Kwanggyo (1x)]williams (1x)[a]	1210	361	lysine	Glutamic acid	AAG	GAG
York (1x)	1138	337	cystein	arginine	TGC	CGC
York (2x)	1138	337	cystein	arginine	TGC	CGC
[York (1x)]williams (1x)[b]	1138	337	cystein	arginine	TGC	CGC
Ogden (1x)	3079	984	Asparagine	Asparatic acid	AAT	GAT

(1x)= گیاهی که برای اولین بار مایه‌زنی شده است، (2x)= گیاهی که با پاساژ سریالی برای بار دوم، با بکار بردن عصاره گیاه آلوده شده در مایه‌زنی اول به عنوان مایه تلقیح، آلوده شده است، a: گیاه Williams 82 که با عصاره گیاه Kwanggyo آلوده به ویروس مایه‌زنی شده است، b: گیاه Williams که با عصاره گیاه York آلوده به ویروس مایه‌زنی شده است.

(1x)= A plant that was inoculated for the first time, (2x) = A plant that has been infected with a serial passage for the second time using sap from the first infected plant as the inoculum, a: The Williams genotype that inoculated with sap from Kwanggyo genotype infected with the virus, b: The Williams genotype that inoculated with sap from York genotype infected with the virus.

در ادامه این مطالعه، به‌منظور اثبات اینکه این جهش(های) نقطه‌ای، برای فائق آمدن بر مقاومت در ژنوتیپ‌های سویای دارای آلل‌های ژن مقاومت *Rsv1* کافی است، ساخت سازه‌های عفونی از سویه‌های N جهش‌یافته ویروس، انجام خواهد شد و با انتقال مستقیم این سازه‌ها به‌وسیله تفنگ ژنی به سیتوپلاسم سلول گیاهی، توانایی بیماری‌زایی آنها اثبات خواهد شد.

منابع

1- Ahangaran A., Mosahebi Mohammadi G.H., Koohi Habibi M., Khezri S., and Shahraeen N. 2009. Use of rapid serological and nucleic acid-based methods for detecting the *Soybean mosaic virus*. Journal of Agricultural Science

and Technology 11: 91-97.

2- Ahangaran A., Koohi Habibi M., Mosahebi Mohammadi G.H., Winter S., and Garcia-Arenal F. 2013. Analysis of Soybean mosaic virus genetic diversity in Iran allows the characterization of a new mutation resulting in overcoming Rsv4-resistance. Journal of General Virology 94: 2557-2568.
3- Bachkar C.B., Balgude Y.S., Shinde P.B., and Deokar C.D. 2019. Screening of soybean genotypes against soybean mosaic virus under natural and glass house conditions. International Journal of Chemical Studies 7(1): 2267-2269.
4- Chen P., Buss G.R., Roane C.W., and Tolin S.A. 1991. Allelism among genes for resistance to soybean mosaic virus in strain-differential soybean cultivars. Crop Science 31: 305-309.
5- Chen P., Ma G., Buss G.R., Gunduz I., Roane C.W., and Tolin S.A. 2001. Inheritance and allelism of Raiden soybean for resistance to soybean mosaic virus. Journal of Heredity 92: 51-55.
6- Chen P., Buss G.R., Tolin S.A., Gunduz I., and Cicek M. 2002. A valuable gene in Suweon 97 soybean for resistance to soybean mosaic virus. Crop Science 42: 333-337.
7- Eggenberger A.L., Hajimorad M.R., and Hill J.H. 2008. Gain of virulence on *Rsv1*-genotype soybean by an avirulent *Soybean mosaic virus* requires concurrent mutations in both P3 and HC-Pro. Molecular Plant-Microbe Interaction 21: 931-936.
8- Golnaraghi A.R., Shahraeen N., Pourrahim R., Farzadfar SH., and Ghasemi A. 2004. Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. Plant Disease 88: 1069-1074.
9- Hajimorad M.R., Eggenberger A.L., and Hill J.H. 2003. Evolution of Soybean mosaic virus-G7 molecularly cloned genome in *Rsv1*-genotype soybean results in emergence of a mutant capable of evading Rsv1-mediated recognition. Virology 314: 497-509.
10- Hajimorad M.R., Eggenberger A.L., and Hill J.H. 2008. Adaptation of *Soybean mosaic virus*Avirulent Chimeras Containing P3 Sequences from Virulent Strain to *Rsv1*-Genotype Soybeans Is Mediated by Mutations in HC-Pro. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: 7937-946.
11- Hajimorad M.R., Wen R.H., Eggenberger A.L., Hill J.H., and Saghai Maroof M. A. 2011. Experimental adaptation of an RNA virus mimics natural evolution. Journal of General Virology 85: 2557-2564.
12- Hajimorad M.R., Domier L.L., Tolin S.A., Whitham S.A., and Saghai Maroof M.A. 2018. *Soybean mosaic virus*: A successful potyvirus with a wide distribution but restricted natural host range. Molecular Plant Pathology 19: 1563-1579.
13- Hamzeh N., Mosahebi Mohammadi G. H., Koohi Habibi M., and Mohammadi M. 2006. Identification and detection of Soybean mosaic virus in Mazandaran and Golestan provinces. Iranian Magazine of Agriculture Sciences 37(4): 637-643.
14- Hayes A.J., Jeong S.C., Gore M.A., Yu Y.G., Buss G.R., Tolin S.A., and Saghai Maroof M.A. 2004. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. Genetics 166: 493-503.
15- Jian-Zhong L., Yuan F., and Hongxi P. 2016. The current status of the soybean- Soybean mosaic virus (SMV) pathosystem. Frontiers Microbiology 7: article 1906.
16- Jonathan DG J. 1996. Plant disease resistance genes: structure, function and evolution. Current Opinion in Biotechnology 7: 155-160.
17- Khatabi B., Fajolu O.L., Wen R.-H., and Hajimorad M.R. 2012. Evaluation of North American isolates of *Soybean mosaic virus* for gain of virulence on *Rsv*-genotype soybeans with special emphasis on resistance-breaking determinants on *Rsv4*. Molecular Plant Pathology 13: 1077-1088.
18- Kiihl R.A.S., and Hartwig E.E. 1979. Inheritance of reaction to Soybean mosaic virus in soybeans. Crop Science 19: 372-375.
19- Lommel S.A., McCain A. H., and Morris T. J. 1982. Evolution of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology 72: 1018-1022.
20- Ma G., Chen P., Buss G.R., and Tolin S.A. 1995. Genetic characteristics of two genes for resistance to soybean mosaic virus in PI486355 soybean. Theoretical and Applied Genetics 91: 907-914.
21- Ma G., Chen P., Buss G.R., and Tolin S.A. 2003. Genetic study of a lethal necrosis to Soybean mosaic virus in PI 507389 soybean. Journal of Heredity 94(3): 205-211.
22- Naghavi A., koohi Habibi M., and Firouzabadi F.N. 2008. Detection and identification of some soybean viral mosaic viruses, using molecular techniques in Lorestan province, south west of Iran. Asian Journal of Plant Science 7(6): 557-562.
23- Stacey G., and Jorgensen R. A. 2008. Genetics and Genomics of Soybean. Springer Science + Business Media, Vol. 2.
24- Saghai Maroof M.A., Tucker D.M., and Tolin S.A. 2008. Genomics of Viral-Soybean Interactions. *Genetics and Genomics of Soybean,* Springer Science + Business Media 293-319.
25- Takahashi H., Miller J., Nozaki Y., Takeda M., Shah J., Hase S., Ikegami M., Ehara Y., and Dinesh-Kumar S.P. 2002. RCY1, an Arabidopsis thaliana RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. The Plant Journal 32: 655-667.

26- Wang L., Eggenberger A.L., Hill J., and Bogdanove A.J. 2006. *Pseudomonas syringae* effector *avrB* confers soybean cultivar-specific avirulence on *Soybean mosaic virus* adapted for transgene expression but effector *avrPto* does not. Molecular Plant-Microbe Interact 19: 304-312.
27- Wen R.H., Saghai Maroof M.A., and Hajimorad M.R. 2011. Amino acid changes in P3, and not the overlapping *pipo*-encoded protein, determine virulence of *Soybean mosaic virus* on functionally immune *Rsv1*-genotype soybean. Molecular Plant Pathology 12: 799-807.
28- Wen R.H., Khatabi B., Ashfild T., Saghai Maroof M.A., and Hajimorad M.R. 2013. The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent *Soybean mosaic virus* are recognized by different resistance genes at the complex *Rsv1* locus. Molecular Plant-Microbe Interactions 26(2): 203-215.
29- Widyasary K., Alazem M., and Kim K. 2020. Soybean resistance to Soybean Mosaic Virus. Plants 9(2): 219-238.
30- Zhang C., Hajimorad M.R., Eggenberger A.L., Tsang S., Whitham S.A., and Hill J.H. 2009. Cytoplasmic inclusion of Soybean mosaic virus serves as avirulence determinant on Rsv3-genotype soybean and a symptom determinant. Virology 391: 240-248.

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 2, Summer 2021, P. 155-167

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۱۶۷-۱۵۵

Reaction of Soybean Genotypes Containing Alleles of *Rsv1*-Resistance Gene Inoculated with Three Strain of Soybean Mosaic Virus

J. Ramezani Avval Reiabi[1]– M. Mehrvar[2*]– M. ZakiAghl[3]– A.R. Mohammadzadeh[4]– M.R. Hajimorad[5]

Received: 11-05-2020
Accepted: 19-12-2020

Introduction: Among legumes, soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is an important plant that grown throughout the world. There are many pathogens that reduce soybean yield. Plant viral diseases cause serious economic losses in many major crops by reducing yield and quality. Soybean mosaic virus (SMV) is amongst important pathogens that infect soybean. Plants use resistance genes against the invasive pathogens. The identification mechanism is based on gene-for-gene hypothesis. Plant resistance (*R*) genes direct recognition of pathogens harboring matching avirulent genes (signals) leading to activation of host defense responses. It has long been hypothesized that under selection pressure the infidelity of RNA virus replication together with large population size and short generation times results in emergence of variants (mutants) capable of evading *R*-mediated recognition. Four *R* gene including *Rsv1*, *Rsv3*, *Rsv4* and newly *Rsv5* have found in soybean operating against SMV.

Materials and Methods: In this study, *Rsv1*/Soybean mosaic virus (SMV) pathosystem was used to investigate this hypothesis. Infectious cDNA clones of SMV-N (pSMV-N) and SMV-G7 (pSMV-G7) inoculated biolistically on Essex (*rsv1*) and SMV-G7d (pSMV-G7d) on Williams82 (*rsv1*) served as the sources of parental viruses. Sap containing viral progenies in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, derived from the infected tissues of biolistically inoculated Essex (rsv1) and Williams82 (rsv1) served as inoculum to mechanically inoculate carborundum-dusted primary leaves of other soybean genotypes. Soybean genotypes containing alleles of *Rsv1* were inoculated with SMV strains N, G7 and G7d. Soybean genotype Williams82 (*rsv1*), susceptible to all strains of SMV and *Rsv1*-genotype soybean PI96983, Kwanggyo (*Rsv1-k*), Marshal (*Rsv1-m*), Ogden (*Rsv1-t*), Raiden (*Rsv1-r*), Suweon97 (*Rsv1-sk*) and Touson50 (*Rsv1-n*) were used in this study. All soybean seed were obtained from field-grown plants shown to be free of SMV by indexing. The inoculated plants were maintained in a growth chamber operating at 22˚C with a photoperiod of 16h light and 8h dark. After twenty one days of post-inoculation, plants were examined by indirect ELISA and RT-PCR. Nested PCR was done and after Sanger sequencing of PCR products, results were analyzed by using Finch TV and MEGA7 software. Total RNA was isolated from top fully-developed systemically infected trifoliate leaves using an RNeasy Plant mini kit (Qiagen) as instructed by the manufacturer. RT-PCR was done in the presence of Superscript reverse-transcriptase III (Invitrogen) as instructed by the manufacturer. Nested PCR amplification of the entire HC-pro and P3 cistrons was done using two pairs of primers, SMV-239s / SMV-3910a and SMV-482s / SMV-3840a, in the presence of EX Taq polymerase (Takara Bio). The resultant amplicons were purified with a QIAquick-PCR Purification Kit (Qiagen) or MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced using primers SMV-1468s, SMV-1614a, SMV-2289s and SMV-2916s. Sequencing was done at The University of Tennessee DNA Sequencing Facility.

Results and Discussion: One out of ten York and Kwanggyo plants and two out of thirty Ogden plants inoculated with viral progeny derived from the reproduction of soybean mosaic virus strain N complementary DNA (c-DNA) molecule on susceptible soybean plants, which was cloned in the laboratory (molecularly cloned SMV-N or pSMV-N) showed viral symptoms and were positive in indirect ELISA. In mechanical inoculation using the sap from these plants, the virus was again transferred to York, Kwanggyo and Ogden plants and subsequently was adapted to these plants. After performing RT-PCR test and determining the full-length sequence of the HC-Pro (Helper Component-Protease) and P3 cistrons of the virus, the position of the point mutation and the amino acid encoded by the nucleotide exchange at the mutation point, using MEGA7 software, was identified. In York and Kwanggyo plants, a point mutation was observed in the HC-Pro whereas in the Ogden plant in the P3 cistron.

Conclusion: The evolution of viruses is unavoidably linked to the evolution of their hosts. Due to the mutations in virus genome and the breakdown of resistance of various soybean genotypes, as well as the fact that the genome

1, 2 and 3- Ph.D. Student of Plant Pathology and Associate Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)
4- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad
5- Associate Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, Institute of Agriculture, University of Tennessee, Knoxville
DOI: 10.22067/jpp.2021.32763.0

of the soybean mosaic virus is RNA type and the possibility of mutation is high, it can be a warning sign for plant breeders producing soybean plants with resistance genes to different strains of the virus. RNA viruses apply all known mechanisms of genetic variation to ensure their survival. Also, the intersection of resistant and susceptible genotypes and the study of the allele of resistance genes can be effective in producing resistant genotypes. The identities of different Rsv genes need to be revealed and the key components in SMV resistant signaling pathway need to be identified. So, a good breeding-for-resistance strategy would aim to develop cultivars with resistance against a wide range of strains of SMV. Transgenic soybean lines expressing part of the P3 and HC-Pro genes have been showed a stable and enhanced resistance to several strains of SMV and have the potential to significantly increase soybean yield.

Keywords: Point mutation, *Rsv1*-resistance gene, Soybean, Soybean mosaic virus